



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Tollarsjuka – Resultat av ett naturligt urval?

Lovisa Hällström

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:08

Tollarsjuka – Resultat av ett naturligt urval?

"Tollarsjuka" – The outcome from a natural selection?

Lovisa Hällström

Handledare: Magnus Åbrink och Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: 2015:08

Nyckelord: Autoimmunitet, Tollarsjuka, IMRD, SRMA, DLA klass II

Key words: Autoimmunity, IMRD, SRMA, DLA class II

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturöversikt	4
Autoimmunitet i den skandinaviska tollarpopulationen	4
Immun medierad reumatisk sjukdom (IMRD)	4
Steroid responsiv meningit arterit (SRMA)	5
Genetiska studier av tollarsjukan	6
Studie över DLA klass II	6
Genome-wide association mapping	7
Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) pathway	7
Kandidatgener	8
CDV – orsak till autoimmunitet?	9
Diskussion	10
Referenser	13

SAMMANFATTNING

Hundrasen Nova Scotia Duck Tolling Retriever (Tollare), en apportrande ras med ursprung i Kanada, var i början på 1900-talet nära att utrotas på grund av två epidemier av valpsjuka som härjade i landet. I dag har rasen rapporterats vara predisponerad för vissa immunmedierade sjukdomar däribland s.k. tollarsjuka. Tollarsjuka används i dagligt tal och är egentligen ett samlingsbegrepp för två olika immunmedierade sjukdomar: en SLE (systemisk lupus erythematosus)-liknande reumatisk sjukdom samt en aseptisk meningit. Vid den reumatismliknande sjukdomen ses stelhet i leder och vandrande hälta som går i skov. Hos drabbade hundar kan man ofta påvisa antinukleära antikroppar (ANA) vilket är karaktäristiskt för autoimmuna sjukdomar av SLE-karaktär. Vid den aseptiska meningiten visar drabbade hundar smärta från nacken, nedsatt allmäntillstånd, feber och anorexi. Båda sjukdomsformerna kan behandlas med kortikosteroider men resultatet varierar. Sjukdomskomplexet anses vara av multifaktoriell och multigenetisk karaktär. Predisponeringen kan vara ett resultat av att rasen härstammar från de få individer som överlevde epidemierna. Förmodligen hade de en gynnsam uppsättning av gener som bidrog till deras överlevnad. Syftet med denna litteraturstudie är att sammanställa den kliniska bilden vid tollarsjuka, vilka genetiska riskfaktorer som identifierats och om det finns en koppling mellan epidemierna och predisponeringen för autoimmuna sjukdomar.

Flera genetiska studier har utförts för att identifiera genuppsättningar som kan vara kopplade till sjukdomen. En studie identifierade en dog leukocyte antigen (DLA) klass II-haplotyp (DLA-DRB1*00601/DQA1*005011/DQB1*02001) med stark association till sjukdomsutveckling för den reumatismliknande sjukdomen. Ingen koppling mellan DLA klass II och meningitformen kunde ses. Avelsrekommendationer efter DLA-haplotyp är dock inte aktuellt då DLA klass II bara är en av flera riskfaktorer involverad i denna komplexa multifaktoriella sjukdom. En genom-wide association study (GWAS) utfördes där ytterligare fem riskloci med association till sjukdomskomplexet identifierades. Totalt ansågs fem gener (*PPP3CA*, *HOMER2*, *PTPN3*, *DAPPI* och *BANK1*) extra intressanta baserat på deras biologiska funktion. De identifierade kandidatgenerna kodar för proteiner med koppling till immunförsvaret. Flera av dessa är involverade i NFAT pathway som visats spela en stor roll både för T-cells aktivering och för utveckling av perifer tolerans. Förändringar i dessa gener skulle kunna leda till ett starkare immunsvaret vilket är en trolig förklaring till den höga prevalensen av autoimmunitet inom rasen men även en förklaring till varför vissa tollare överlevde infektionerna med valpsjukevirus.

Mer forskning behövs inom området för att bättre förstå sjukdomsförloppet. Förändringarna i riskgener behöver identifieras, det immunologiska svaret studeras och samspelet mellan riskfaktorer, såväl genetiska som miljöfaktorer behöver hittas.

SUMMARY

The Nova Scotia Duck Tolling Retriever (Toller) is a retrieving dog breed from Canada. Early in the 20th century, two epidemics of the Canine Distemper Virus (CDV) almost destroyed the whole breed and only a few survived. The breed is today predisposed to some autoimmune diseases, for example a disease complex called “Tollarsjuka”. The disease complex involves steroid responsive meningitis arteritis (SRMA) and a SLE (systemic lupus erythematosus)-related disease named immune-mediated rheumatic disease (IMRD). The disease complex is considered being both multifactorial and multigenetic, and is the most common in the population of Scandinavian Tollers. Dogs with IMRD show chronic stiffness and pain from joints and lameness. They often display antinuclear antibodies (ANA). Characteristics for the aseptic meningitis are pain from the neck, depression, fever and anorexia. The disease can be treated with corticosteroids but it does not always work. The autoimmune diseases can be a consequence from the few individuals that survived the epidemics; they probably survived due to genes that resulted in a more effective anti-viral immune response. The aim of this literature report is to summarize the clinical manifestations of disease complex, the identified genetic risk factors associated with the disease and search for a possible connection between the epidemics and the autoimmune diseases.

Genetic studies have identified risk factors. One study shows that a DLA class II-haplotype (DLA-DRB1*00601/DQA1*005011/DQB1*02001) is strongly associated with the rheumatic disease. No association between DLA class II and SRMA was found. It is not yet possible to give breeding recommendation about which dogs to use based on the DLA class II, this is because there exist multiple risk factors involved in the pathogenesis of this disease. In another study a genome-wide association mapping (GWAM) was performed and five risk loci with association to the disease were identified. Five genes (*PPP3CA*, *HOMER2*, *PTPN3*, *DAPPI* and *BANK1*) on these loci were very interesting based on their biological function. The identified candidate genes all have some connection to the immune system. Many of them are involved in the NFAT pathway, which plays a crucial role in the activation of T-cells and the development of peripheral tolerance. Many of these genes are already identified as risk factors for development of human SLE. Changes in these could result in a stronger immune response and explain the high prevalence of autoimmune diseases in the breed. It also could explain why some dogs survived the epidemics back in the 20th century. More research is needed to better understand the disease and how it develops.

INLEDNING

Nova Scotia Duck Tolling Retriever är den minsta retrieverrasen och kallas i dagligt tal för tollare. Rasen härstammar från Nova Scotia i Kanada. Tollaren skiljer sig från övriga retrieverraser genom att den ska arbeta både före och efter skott. Arbetet före skott kallas tolling och går ut på att hunden leker, hoppar och busar längst strandkanten så att änder lockas inom skotthåll för en gömd skytt. Efter skottet ska hunden apportera det fallna viltet. Den första tollaren kom till Sverige på 1980-talet och varje år registreras ca 400 nya tollare i Sverige (Nova Scotia Duck Tolling Retrieverklubben, 2015).

I början av 1900-talet härjade två epidemier med Canine Distemper Virus (CDV) i Nova Scotia-området och få individer inom rasen överlevde. Avelsmaterialet blev begränsat och en s.k. genetisk flaskhals skapades (Strang & MacMillan, 1996). På senare år har det uppmärksammats att tollare är överrepresenterade för vissa autoimmuna sjukdomar såsom Addisons sjukdom (Hughes *et al.*, 2010), den SLE-relaterade sjukdomen immun medierad reumatisk sjukdom (IMRD) (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009) och steroid responsiv meningit arterit (SRMA) (Anfinsen *et al.*, 2008, Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013). Predisponeringen för autoimmuna sjukdomar kan vara ett resultat av det smala avelsmaterialet som användes för att hindra rasen från att utrotas (Wilbe, 2013). Olika autoimmuna sjukdomar syns i olika tollarpopulationer. Tollarsjuka, som inkluderar SRMA och den SLE-relaterade sjukdomen IMRD är vanligast i den skandinaviska populationen.

Vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) bedrivs forskning som omfattar både kliniska och genetiska studier av tollarsjukan. Syftet med denna litteraturstudie är att ta reda på hur den kliniska bilden vid tollarsjuka ser ut, vilka genetiska riskfaktorer som har association till sjukdomen och om det finns någon trolig förklaring till varför rasen är predisponerad för autoimmuna sjukdomar.

MATERIAL OCH METODER

Denna litteraturstudie baseras framförallt på vetenskapliga artiklar hämtade från databaserna Primo, Web of Science och PubMed. De sökord som använts är (Nova Scotia Duck Tolling Retriever AND/OR toller*), (Dog* AND/OR canin*), (Steroid-responsive meningitis-arthritis OR/AND SRMA), (immune-mediated rheumatic disease AND/OR IMRD), (Systemic Lupus Erythematosus OR/AND SLE OR/AND SLE-related disease), (T-Cell* AND/OR B-cell*), (Antibod* AND auto* OR/AND ANA) i olika kombinationer. Från artiklar har jag hittat vidare intressanta artiklar och mina handledare har bidragit med några artiklar. Förutom vetenskapliga artiklar har hemsidor där relevant och tillförlitlig information funnits använts.

LITTERATURÖVERSIKT

Autoimmunitet i den skandinaviska tollarpopulationen

Tollarsjuka är ett sjukdomskomplex som inkluderar två sjukdomsformer: SLE-liknande immun medierad reumatisk sjukdom (IMRD) och steroid responsiv menigit arterit (SRMA)(Wilbe *et al.*, 2010). De båda sjukdomsformerna uttrycker sig olika kliniskt men anses båda vara immunmedierade (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009, 2013). Behandling med kortikosteroider har visats ha god effekt hos båda sjukdomsformerna men både återfall och uteblivet svar på behandling har setts. I vissa fall krävs en livslång behandling (Anfinsen *et al.*, 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013). Det är fortfarande oklart om de två sjukdomsformerna tillhör samma sjukdomskomplex eller är två olika sjukdomar (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; Wilbe *et al.*, 2009; Wilbe *et al.*, 2010; Wilbe & Andersson, 2012; Wilbe, 2013). Enbart en av flera genetiska riskfaktorer är gemensam för de två sjukdomsformerna (Wilbe *et al.*, 2010) och drabbade hundar utvecklar antingen SRMA eller IMRD. I enstaka fall har dock hundar diagnostiserade med SRMA senare i livet utvecklat de reumatismliknande symptomen (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013).

Bägge formerna av tollarsjuka anses vara multifaktoriella precis som SLE är hos människa där både genetiska och miljöfaktorer spelar roll. Vilka miljöfaktorer som bidrar till sjukdomsutveckling har dock inte identifierats (Wilbe, 2013). I en undersökning om SRMA-förekomst i den norska tollarpopulation kunde en gemensam "founder dog" identifieras för alla sjuka individer men nedärvingen visade inte ett enkelt Mendelsk recessivt mönster (Anfinsen *et al.*, 2008). Wilbe *et al.* (2009) anger att inget specifikt nedärvningsmönster har kunnat ses i den svenska tollarpopulationen. En drabbad hunds uppsättning av genetiska riskfaktorer, genetisk bakgrund och miljöfaktorer är inblandade i utveckling av sjukdom och dess svårighetsgrad. Därmed kan sjukdomens etiologi skilja sig mellan individer som ärvt samma genetiska riskfaktorer (Wilbe & Andersson, 2012).

Vid SLE hos människor ses hyperaktivering av både T- och B-celler (Guerra *et al.*, 2012) och antinukleära antikroppar (ANA) är karaktäristiskt för sjukdomen. ANA är en typ av autoantikroppar som riktar sig mot kroppsegna nukleära strukturer. För att identifiera och mäta ANA används indirekt immunfluorescens- (IIF-) teknik i ett s.k. IIF-ANA-test. Resultatet från IIF-ANA-testet delas in i två olika fluorescerande mönster, homogent eller kornigt. De olika mönstren visar på olika reaktivitet hos antikropparna (Hansson *et al.*, 1996). ANA med homogent mönster visar kromosomreaktivitet medan ANA med kornigt mönster saknar reaktivitet mot kromosomstrukturer (Hansson-Hamlin *et al.*, 2006). Endast tollare med IMRD är ANA-positiva vid testning.

Immun medierad reumatisk sjukdom (IMRD)

Hundar som utvecklar IMRD-formen av tollarsjuka visar symptom liknande de för systemiska autoimmuna reumatiska sjukdomar. Drabbade hundar får kroniska symptom från rörelseapparaten med stelhet och smärta från flertalet leder och ibland även muskelsmärta. Symptomen är värst efter vila och blir mindre uttalade efter aktivitet. Hältan är ofta långvarig och går i skov. Dessutom vandrar hältan ofta mellan de olika benen och de drabbade lederna

är främst karpal-, armbågs-, och/eller knäled. Vanligtvis kan ingen svullnad påvisas från smärtsamma leder. Mer ovanliga symptom är feber och hudförändringar. Hudförändringar ses då främst på öronlappar och nosrygg (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). Det har inte setts någon könsskillnad bland hundarna som insjuknat. Symptom uppkommer i 1-5 års ålder där medelåldern är 3 år (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). I Sverige är prevalens av IMRD beräknad till 2 % (Wilbe, 2013).

I en studie undersöktes kliniska och klinkemiska fynd hos tollare med systemiska reumatiska symptom. Där visades att drabbade hundar visar smärta vid manipulering av minst två leder i extremiteterna men röntgenresultat visade inga förändringar eller skador i de smärtsamma lederna (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). Detta var även resultatet i Axelssons examensarbete (2007). Röntgenfynden tyder alltså på att hundarna drabbas av en icke-erosiv polyartrit. I samma studie visade sjuka hundar förhöjda halter av akutfasproteinerna fibrinogen och alfa-2-globulin samt en lägre lymfocythalt i blod jämfört med friska hundar (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). I ett examensarbete analyserades även förekomsten av interleukin-6 (IL6) hos sjuka hundar men enbart en av 20 sjuka hundar visade positivt svar (Axelsson, 2007). I samma examensarbete noterades vaccinationsstatus hos både sjuka och friska individer men ingen skillnad kunde noteras (Axelsson, 2007).

De flesta sjuka hundar med IMRD är ANA-positiva. Ungefär 40 % av de ANA-positiva hundarna i Hansson-Hamlin och Lilliehööks studie (2009) visade homogent ANA-mönster medan 60 % visade kornigt ANA-mönster. Hundar med hudförändringar i studien visade ett homogent mönster vilket tyder på att antikropparna är riktade mot kromosomala strukturer (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009). Karaktär och förekomst av ANA hos hund är dock inte fullt utredd (Hansson-Hamlin *et al.*, 2006) och den specifika ANA-reaktiviteten hos tollare är fortfarande okänd (Wilbe, 2013). Generellt sett är ANA-test av stor betydelse för diagnostik av autoimmuna sjukdomar även om ett positivt ANA-resultat i sig inte enbart kan användas för att ställa diagnos vilket kräver att både symptombild, kliniska fynd och laborativa fynd vägs in (Hansson *et al.*, 1996; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009)

Steroid responsiv meningit arterit (SRMA)

Hundar med diagnosen SRMA drabbas av en aseptisk meningit. De visar smärta och stelhet från nacken, nedsatt allmäntillstånd, anorexi och stelt rörelsemönster. Hög feber är vanligt förekommande. Ovanligare men förekommande symptom är problem att öppna munnen samt ökad flåsighet (Anfinsen *et al.*, 2008; Wilbe *et al.*, 2009). SRMA är en sjukdom som främst drabbar unga hundar (Anfinsen *et al.*, 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013) mellan 3,5 till 24 månader gamla (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013). I Norge har prevalensen uppskattats till minst 2,5 %. Det verkar inte vara någon skillnad i förekomst mellan sjuka tikar och hanar (Anfinsen *et al.*, 2008).

I en studie har tollare med SRMA setts ha ökade halter av leukocyter i blodet och en ökad infiltration av leukocyter i cerebrospinalvätska. I samma studie visade alla hundar med akut SRMA förhöjda CRP-värden men var ANA-negativa (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2013).

Genetiska studier av tollarsjukan

Den senaste tiden har genetiska studier utförts för att hitta gener med koppling till tollarsjukan. I studierna har de två formerna, IMRD och SRMA, undersökts både som två separata sjukdomar och som en gemensam sjukdom. En kandidatgen-approach-studie och en genom-wide association mapping (GWAM) har utförts.

Studie över DLA klass II

Kandidatgen-approach-studier baseras på en hypotesriktad sökning där uttrycket av kandidatgenen studeras hos både sjuka och friska individer. Hos människor har vissa MHC klass II locus kunnat kopplas till ökad risk för utveckling av autoimmuna sjukdomar (Graham *et al.*, 2002). Major histocompatibility complex (MHC) klass II molekyler återfinns på antigenpresenterande celler (APC) och är därför starkt involverade i immunförsvaret. MHC-molekylen kallas hos hund för dog leukocyte antigen (DLA). DLA klass II omfattar totalt fyra loci hos hund, DLA DRB1, -DRA, -DRQA och DQB1. I varje loci finns en funktionell gen. Associationer mellan autoimmuna sjukdomar och vissa allela former av DLA klass II har visats flertalet gånger enligt Wilbe *et al.* (2009) vilket var anledningen till att den riktade sökningen mot DLA klass II-gener utfördes.

I studien undersöktes förekomsten av haplotyper och genotyper av DLA klass II-gener i den skandinaviska tollarpopulationen. Totalt hittades 5 olika haplotyper och 13 olika genotyper, alla haplotyper men bara de 5 vanligaste genotyperna utreddes vidare. Heterozygot form av två olika haplotyper (haplotyp 1 och 2) är vanligast och dessa två haplotyper förekommer i ca 75 % av den skandinaviska tollarpopulationen. För hundar med IMRD kunde en riskhaplotyp identifieras. Däremot kunde varken riskhaplotyp eller -genotyp påvisas för hundar med SRMA. En signifikant skillnad visades mellan haplotyp 2 (DLA-DRB1*00601/DQA1*005011/DQB1*02001) hos individer med IMRD och ANA-positivitet jämfört med kontroller. I riskhaplotypen finns en region som kodar för aminosyrorerna arginin-alanin-arginin-alanin-alanin (RARAA) (Wilbe *et al.*, 2009) och i tidigare studier har denna grupp av aminosyror visats utgöra en epitop relaterad till reumatoid artrit hos människor (Fernando *et al.*, 2008). Fortsatta funktionella studier behövs för att utreda om DLA klass II molekylen presenterar ett gemensamt autoantigen med denna epitop. Dessutom kvarstår det att avgöra om DR och/eller DQ står för den genetiska riskfaktorn (Wilbe *et al.*, 2009).

Analyser av genotyper visade att fler hundar med IMRD var homozygota för haplotyp 2 jämfört med kontroller. Jämförelse av homozygoti mot heterozygoti av alla haplotyper bekräftade att homozygot form av DLA klass II är ofördelaktigt, speciellt homozygot form av haplotyp 2. Studien visade även att den genetiska variationen av DLA klass II är liten i tollarpopulationen och homozygoti är ett vanligt fenomen (Wilbe *et al.*, 2009).

I senare studier undersöktes association mellan DLA klass II och olika ANA-mönster. Homozygot form av haplotyp 2 ger ökad risk för att utveckla IMRD med kornigt ANA-mönster men ingen signifikant association hittades mellan haplotyp/genotyp av DLA klass II och utveckling av IMRD med homogent ANA-mönster (Wilbe, 2013).

Genome-wide association mapping

Vid GWAM skannas hela genomet i jakt på genetiska skillnader mellan sjuka och friska individer. Associationer kan då ses mellan olika loci och sjukdom. Genom GWAM av den skandinaviska tollarpopulationen kunde totalt fem regioner i genomet identifieras med association till tollarsjuka. Genom fine-mapping av regionerna verifierades vissa loci. DLA klass II locus påvisades dock inte i denna studie vilket Wilbe *et al.* (2010) tror beror på brist av SNP:s i den regionen av genomet som omfattar DLA-generna.

Totalt hittades fem loci på kromosomerna 3, 8, 11, 24 och 32 vid GWAM av sjukdomarna tillsammans och av sjukdomarna var för sig. Efter fine-mapping blev tre loci (på kromosom 3, 11 och 24) starkt validerade medan de andra två (på kromosom 8 och 32) visade svagare association. Locus på kromosom 32 visade association både för sjukdomarna tillsammans och separat. Hos kromosom 8 hittades en association med ett locus till de båda sjukdomarna separat men inte tillsammans (Wilbe *et al.*, 2010). Wilbe *et al.* (2010) anser att det är oklart om detta loci innehåller en gemensam riskfaktor för flera sjukdomar eller flera riskfaktorer.

Wilbe *et al.* (2010) menar att de identifierade regionerna på kromosomerna omfattar många potentiella kandidatgener med tanke på dessa geners biologiska funktion. Regionerna omfattar dock flertalet gener och vilken gen som orsakar sjukdom kunde inte avgöras i denna studie. När GWAM enbart gjordes för tollare med IMRD som var ANA-positiva hittades starka associationer för regioner som omfattar generna *DAP1*, *PPP3CA* och *BANK1*. *DAP1* finns i regionen där association fanns till båda sjukdomsformerna (Wilbe *et al.*, 2010). I studien hittades även flera regioner som omfattar gener involverade i T-cells aktivering via NFAT pathway.

Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) pathway

NFAT är transkriptionsfaktorer involverade i immunsvaret. NFAT-familjen inkluderar fem medlemmar varav fyra (NFATc1, NFATc2, NFATc3 och NFATc4) är kontrollerade via kalcium/calmodulin-beroende fosfatas calcineurin (Serfling *et al.*, 2006). NFAT finns normalt i cytoplasman i ett fosforylerat stadie (Valdor och Macian, 2013). Till en början beskrevs NFAT bara som nukleära proteiner i T-lymfocyter som band in och kontrollerade aktiviteten av IL-2 promotorer och andra lymfokinpromotorer/enhancers. Nu har NFAT påvisats i flertalet celler och de verkar ha en multifunktionell roll. De är viktiga för T-cells aktivering och skapandet av perifer tolerans mot kroppsegna strukturer. Perifer T-cells tolerans skapas genom induktion av anergy, genom suppression av T-celler via regulatoriska T-celler och via activation-induced cell death (AICD). Dessa kontrolleras till stor del av NFAT och alla tre delar är viktig för att skapa en perifer tolerans. NFAT har även visats vara viktiga förmedlare av regulatoriska T-cellers suppressiva effekter på aktiverade T-celler. Det är dock okänt hur NFAT lyckas med detta (Serfling *et al.*, 2006). Utöver detta är NFAT även känd för att bidra till differentieringen av T-celler till Th1- eller Th2-celler. Th1-svar ses framförallt vid virala och intracellulära bakteriella infektioner där hög IFN-produktion är karaktäristiskt. Th1-svar initieras av att IL-12 och IFN- γ från dendritiska celler och makrofager binder in till receptorer på T-cellen. Signalkaskad sker i celler där transkriptionsfaktorer såsom STAT1 aktiveras. Tillsammans med andra transkriptionsfaktorer såsom NFAT, AP-1 och NF-kB induceras

uttrycket av transkriptionsfaktor T-bet som är det dominerande uttrycket vid ett Th1-svar (Naito *et al.*, 2011).

Calcineurin/NFAT-kaskaden är en av de viktigaste signalvägarna som kontrollerar det adaptiva immunsystemet (Serfling *et al.*, 2006). Calcineurin aktiveras av kalcium vilket leder till en defosforylering av NFAT-transkriptionsfaktorer. Vid defosforylering sker en konformationsförändring av transkriptionsfaktorn vilket leder till att de kan förflytta sig till cellkärnan. I cellkärnan hos aktiverade T-celler binder NFAT främst till AP-1 vilket i sin tur leder till ökat uttryck av flertalet gener involverade i T-cells aktivering. I T-celler som aktiveras suboptimalt kommer AP-1 inte aktiveras i samma utsträckning och NFAT1 kommer bilda homodimerer, dessa kommer binda och inducera transkription av anergi-associerade gener. Syntesen av dessa proteiner kommer leda till inhibering av TCR-signalering och cytokinproduktion, T-cellen kommer ”tystas”. T-celler som saknar NFAT1 har visats vara resistent mot stimuli som inducerar anergi och vid en konstant hög koncentration av aktiv NFAT ses minskad respons hos T-cellen. Detta visar att NFAT1 spelar en central roll vid inducering av anergi hos T-celler (Valdor & Macian, 2013).

I perifera B-celler har NFAT-faktorer visats vara det sista steget i B-cellsreceptor(BCR) aktiveringen. Vid inhibering av NFAT bryts den antigen-inducerade proliferationen av B-celler. Det har visats att när NFATc1 elimineras resulterar detta i en minskning av proliferation hos B-cellen, minskat Ca^{2+} influx, ökad AICD och defekter i antikroppsproduktionen. NFATc1/ α A är en kort isoform av NFATc1 som är den mest uttryckta varianten i effektor B-celler, denna form har visats kunna rädda en B-cell från tidig celldöd (Rudolf *et al.*, 2014).

Kandidatgener

Kandidatgener är gener som troligtvis ligger bakom ett sjukdomsförlopp. Totalt ansågs fem gener vara extra intressanta efter GWAM: *PPP3CA*, *HOMER2*, *PTPN3*, *DAPPI* och *BANK1*. Gener involverade i T-cells aktivering via NFAT pathway är *PPP3CA*, *HOMER2*, *DAPPI* och *PTPN3* (Wilbe *et al.*, 2010). Genen *PPP3CA* kodar för calcineurin som är en Calcium-calmodulin beroende proteinfosfat (Guerini, 1997). För aktivering av NFAT i T-celler har calcineurin visats spela en viktig roll och är därför ett viktigt mål för immunsupprimerande läkemedel (Clipstone & Crabtree, 1992). Calcineurin aktiveras av kalcium som i sin tur aktiverar transkriptionsfaktor NFAT och därmed är calcineurin viktig för aktiveringen av T-celler. *HOMER2* kodar för ett cytoplasmiskt scaffoldprotein som är involverad i samma pathway som calcineurin. Det har dock visats att detta protein fungerar som en negativ reglerare av T-cells aktivering genom att konkurrera med calcineurin om bindning till NFAT (Huang *et al.*, 2008). *PTPN3* tillhör samma familj som *PTPN22* och kodar för ett lymfoid-specifikt tyrosinfosfat (LYP) som är involverat i T-cells aktivering (Wilbe *et al.*, 2010). LYP med en polymorfi i position R620W anses spela roll vid utveckling av SLE hos människa (Chung & Chriswell, 2007). LYP bildar normalt ett komplex med ett kinas (Csk) och komplexet leder till att T-cells aktivering minskar. Mutationen R620W i LYP har visats påverka bindningen till Csk och därmed ge nedsatt funktion av LYP/Csk-komplexet (Zhong & Veillette, 2012). *BANK1* kodar för ett B-cellsspecifikt scaffoldprotein som är involverat i

B-cellssignalering. Silva *et al.* (2014) anger att mutationer i BANK1-genen kan ge upphov till kvarstående B-cellsreceptor-signalering och därmed orsaka hyperaktivitet, vilket kan vara en bidragande orsak till utveckling av SLE. DAPP1 är uttryckt i både B- och T-celler och leder indirekt till en inhibering av T-cells- och B-cellsreceptorer genom att motverka aktiveringen via NFAT pathway (Wilbe *et al.*, 2010).

Hos människa med SLE har många gener med koppling till B- och T-celler identifierats, förutom de som nämnts ovan är även IL-10 intressant (Silva *et al.*, 2014). Interleukin-10 (IL-10) är en viktig immunreglerande cytokin. Genom att motverka uttryck av proinflammatoriska cytokiner inhiberas T-cellers funktion men B-cellers överlevnad, proliferation och differentiering av antikroppsproduktion stärks. Silva *et al.* (2014) anger att studier visar att vissa alleler och haplotyper har association till SLE.

CDV – orsak till autoimmunitet?

Canine distemper virus (CDV) orsakade de förödande epidemierna i början på 1900-talet. CDV orsakar valpsjuka hos hundar och typiska symptom är hög feber, pneumoni, kraftigt påverkat allmäntillstånd och tung andning. Hundar kan även drabbas av allvarliga CNS-skador. Ofta uppstår även sekundära infektioner på grund av att CDV ger upphov till immunosuppression (SVA, 2015). För bekämpningen av virala infektioner spelar typ I interferon (IFN) en viktig och avgörande roll (Petska *et al.*, 2004). En virusinfektion upptäcks genom att pattern-recognition receptors (PRRs) identifierar strukturer associerade med infektion, s.k. PAMPs såsom viral nukleinsyra. Immunceller svarar genom att producera typ I IFN. Typ I IFN i sin tur binder till IFN-receptorer och en cellsignalering startar (Randall & Goodbourn, 2008), signaleringen sker via JAK-STAT-pathway (Petska *et al.*, 2004) och leder till uppreglering av hundratals gener som alla har direkta eller indirekta antivirala effekter (Randall & Goodbourn, 2008). Röthlisberger *et al.* (2010) granskade CDVs effekt på immunförsvaret och hur viruset kan påverka det antivirala svaret vid en infektion. CDV manipulerar typ I IFNs effekter genom att störa den IFN-beroende signaleringen i cellerna. Ett protein hos viruset binder till både STAT1 och STAT2 vilket resulterar i att dessa transkriptionsfaktorer inte kan ta sig in i cellkärnan och uttrycket av antivirala proteiner hämmas (Röthlisberger *et al.*, 2010).

Hos människor med autoimmuna sjukdomar har ökade halter av IFN och ökade IFN-inducerade genuttryck setts, framförallt hos dem diagnostiserade med SLE (Crow *et al.*, 2015). Inom humanmedicinen har många gener med association till SLE identifierats, däribland finns flera med koppling till IFN-reglering, exempelvis IFIH1, IFR5 och TYK2. Förändringar och mutationer i dessa gener har bidragit till ett förändrat uttryck av IFN och IFN-inducerade gener vilket verkar bidra till utvecklingen av SLE (Silva *et al.*, 2014).

DISKUSSION

American College of Rheumatology (ACR) har sammanställt en kriterielista med elva kriterier som kan användas för diagnostisering av SLE hos människa där minst fyra kriterier ska vara uppfyllda. För hund finns ingen liknande kriterielista vilket gör det svårt att ställa rätt diagnos på hundar med SLE eller SLE-relaterade sjukdomar. Dels för att symptomen är överlappande mellan sjukdomarna och dels för att omfattningen av symptom inom en SLE-sjukdom varierar. De olika sjukdomsformerna i tollarsjukan uttrycker sig väldigt olika vilket medfört att frågor om de tillhör samma sjukdom ställts flertalet gånger. För sjukdomarna finns bara ett gemensamt risklocus medan flertalet andra riskloci identifierats för IMRD. Baserat på studiefynd anser Wilbe *et al.* (2009) att det är olika immunmekanismer som ligger bakom de två sjukdomsformerna. Resultat från studier tyder på att de inte är samma sjukdom, dock är det fortfarande oklart om de ska anses tillhöra samma sjukdomskomplex eller om de ska vara två skilda sjukdomar. Omfattningen av symptom och klinisk bild varierar även hos tollare drabbade av IMRD vilket får mig att fundera på om det även där handlar om flera sjukdomar. I en studie visades att ANA med homogent mönster främst förekommer hos hundar med kliniska symptom från flera organ medan ANA med kornigt mönster oftare sågs hos hundar med symptom från rörelseapparaten (Hansson-Hamlin *et al.*, 2006). Hansson-Hamlin *et al.* (2006) anser att olika ANA-mönstren indikerar på olika SLE-sjukdomar, vilket även borde vara fallet hos tollarna som uttrycker olika ANA-mönster. Exempelvis uppvisar tollare med ovanliga symptom, såsom hudförändringar, ett annat ANA-mönster än de som saknade dessa symptom. Hos ett fåtal tollare har även symptom setts från lever och njure. Detta kan tyda på olika sjukdomsformer av IMRD. Dock anses SLE vara en immunkomplexmedierad sjukdom och beroende på var immunkomplexen faller ut ses olika kliniska symptom, vilket skulle kunna förklara variationen av symptom hos sjuka tollare. För att utreda om det rör sig om olika former av reumatismssjukdomar hos tollare skulle ytterligare forskning behövas och bättre kriterier för fastställande av diagnos tas fram.

Vid SLE, som vid andra autoimmuna sjukdomar, verkar toleransen mot kroppsegna strukturer bruten. Om självreaktiva T-celler lyckas undvika den negativa selektionen i tymus kan de perifert skapa autoimmuna reaktioner. Det är därför viktigt att utvecklingen av den perifera toleransen går rätt till (Valdor & Macian, 2013). Flera av de identifierade kandidatgenerna hos sjuka tollare har en koppling till NFAT pathway men de specifika förändringarna i proteinerna är okända. NFAT har visats spela en stor roll vid utvecklingen av perifer tolerans framförallt genom att "tysta" immunceller. Om proteiner involverade i NFAT pathway skulle uttryckas annorlunda skulle resultatet kunna vara att skapandet av perifer tolerans uteblir. Hos människor med SLE har flera mutationer och förändringar setts i proteiner som påverkar toleransutveckling och T-cells aktivering. För LYP har en mutation identifierats som bidrar till inhibering av TCR-signaleringen, hur detta resulterar i autoimmunitet är okänt och mer forskning behövs. Enligt en teori leder detta till minskad negativ selektionen i tymus och därmed kan självreaktiva T-celler ta sig ut i kroppen. En annan teori är att enzymet inhiberar regulatoriska T-celler vilket resulterar i reaktioner mot självantigen (Chung & Chriswell, 2007). För BANK1-genen finns teorier om att mutationer skulle kunna ge upphov till kvarstående B-cellsreceptor-signalering och därmed orsaka hyperaktivitet i B-celler, vilket

kan bidra till utveckling av SLE (Silva *et al.*, 2014). Hos tollare har en uppreglering av BANK1-gener och en nedreglering av LYP setts (Wilbe, 2013). Detta skulle kunna leda till en hyperaktivitet hos både T- och B-celler. Hyperaktivering kan bidra till att tolerans bryts eller uteblir och att reaktioner mot kroppsegna strukturer uppstår, vilket skulle förklara de autoimmuna sjukdomarna som ses i rasen idag. En hyperaktivering av T- och B-celler lär även ha varit gynnsamt vid CDV-epidemierna och en trolig orsak till att vissa tollare klarade sig bättre än andra. Ytterligare forskning av kandidatgener behövs för att identifiera förändringar och se hur de bidrar till sjukdomsutveckling.

DLA klass II har visats ha stark association med utveckling av IMRD men avelsrekommendationer utifrån gentestning av DLA-haplotyp är inte aktuellt. Ärftlighetsmönstret anses vara komplext (Wilbe & Andersson, 2012) och analyser tyder på att sjukdomskomplexet har multigen karaktär (Wilbe *et al.*, 2010). DLA-riskhaplotypen är en av de vanligaste haplotyperna i populationen och dessutom bara en av många genetiska riskfaktorer som påverkar utvecklingen av sjukdom. Wilbe *et al.* (2010) ansåg att alla fem loci som identifierades vid GWAM predisponerar för den SLE-relaterade sjukdomen och bör därför tas med i beräkningarna för utveckling av sjukdom. Skulle alla hundar som bär på genetiska riskfaktorer exkluderas från aveln finns risk för att ytterligare ”genetiska flaskhalsar” skapas. Detta skulle inte leda till en friskare ras utan snarare en ras med andra genetiska sjukdomar. Förutom genetiska riskfaktorer är även miljöfaktorer bidragande till sjukdomsutveckling och sjukdomsutvecklingen kan därmed skilja sig mellan individer med samma genetiska uppsättning. Wilbe (2013) anser att mer forskning skulle behöva utföras där riskgener studeras närmare och hur de påverkar sjukdomens och dess svårighetsgrad. Mer forskning skulle även behövas för att förstå samspelet mellan riskfaktorer och hur de kan bidra till sjukdomsutveckling. Först när forskarna förstår hur allting samspelar kan eventuellt avelsrekommendationer baserat på genetiska tester ges.

Ett starkare immunförsvar hos de få individer som överlevde CDV-epidemierna är en trolig förklaring till deras överlevnad. Förmodligen hade dessa individer en gynnsam genetisk uppsättning som bidrog till det starkare immunförsvaret (Wilbe & Andersson, 2012). Samma genetiska uppsättning skulle kunna predisponera dagens hundar för autoimmuna sjukdomar. Riskregionen på kromosom 32 omfattar flera viktiga gener för immunfunktion och tolerans och hos tollare med riskhaplotyp har en uppreglering av dessa gener setts. Hela denna region kan ha selekterats fram vid epidemierna och då bidragit till överlevnad medan de nu bidrar till utveckling av autoimmunitet (Wilbe, 2013). Ett mönster kring T-cells aktivering kan även ses hos sjuka tollare som också kan ha denna koppling (Wilbe *et al.*, 2010). Förmodligen finns det ytterligare riskfaktorer med koppling både till epidemierna och de autoimmuna sjukdomarna. Eftersom det visats att CDV kan manipulera det antivirala stadiet kan ett annorlunda uttryck av gener involverade i IFN-signalering och reglering ha varit gynnsamt. Om dessa proteiner inte kunde manipuleras lika lätt av viruset skulle överlevnadschanserna öka. Samma genuttryck skulle kunna vara en drivande del i utveckling av autoimmuna sjukdomar hos tollarna. Hos människor har flera gener involverade i IFN-produktion och IFN-inducerade gener setts ha koppling med utveckling av SLE. Det vore därför intressant att studera IFN och IFN-inducerade uttryck hos sjuka tollarindivider och se om de skiljer sig från

friska, som det visats göra hos människor. En intressant fråga är dock varför gener involverade i IFN-produktion och -reglering inte hittats vid de genetiska studierna som gjordes hos tollarna, om det skulle finnas ett samband. En möjlig orsak, precis som varför DLA klass II inte hittades vid GWAM, är att det kan vara brist på SNPs inom de kromosomregionerna som omfattar dessa gener. Sedan den genetiska forskningen har teknikerna blivit bättre och mer av hundens genom har kunnat täckas. Om studierna skulle göras om idag skulle säkert fler genetiska riskfaktorer identifieras och eventuellt gener med koppling till IFN hittas.

Den forskning som bedrivits hittills av tollarsjukan har främst omfattat kliniska och genetiska studier. Eftersom sjukdomarna är immunmedierade vore det intressant att studera immunförsvarets roll vid utveckling av sjukdom närmare. I ett examensarbete analyserades interleukin-6 (IL-6) halter hos sjuka hundar med IMRD men endast en visade positivt svar. Denna hund var även den enda med feber (Axelsson, 2007). IL-6 är en cytokin som är involverad i inflammation och mognaden av B-celler. IL-6 har visats inducera feber hos människor med autoimmuna sjukdomar eller infektioner. Eftersom feber är ovanligt hos tollare med IMRD verkar det mer troligt att de förhöjda IL-6 halterna och febern var ett svar på en infektion och inte på de autoimmuna reaktionerna i kroppen. Förmodligen finns ingen koppling mellan IMRD och förhöjda IL-6 halter. Hos människa med SLE har andra cytokiner som IL-10 och typ I IFN samt IFN-inducerade proteiner setts uttryckas annorlunda. Det vore intressant att studera uttryck av dessa hos sjuka tollare. Hypotesen för IL-10 hos människa är att en onormal IL-10 produktion skulle förvärra inflammation och autoantikroppsproduktion vilket i sin tur skulle vara fördelaktigt för SLE (Silva *et al*, 2014). Genom att studera den histologiska bilden, vilka immunceller som dominerar och vilka cytokiner som uttrycks tror jag att förståelsen skulle öka för sjukdomen och sjukdomsförloppet och dessutom hjälpa till att förstå kopplingen mellan genetiska riskfaktorer och immunförsvaret.

Sammanfattningsvis har forskningen bidragit till en ökad förståelse för tollarsjuka. Troligtvis är de autoimmuna sjukdomarna som ses i rasen idag ett resultat från det smala avelsmaterialet som rasen är byggd på. Mycket tyder på en koppling mellan den genetiska predisponeringen för autoimmuna sjukdomar och tollare som överlevde epidemiernas gener. Mer forskning behövs dock inom området: förändringar i riskgener behöver identifieras, det immunologiska svaret behöver studeras och förståelse över hur samspelet mellan olika faktorer påverkar och samverkar vid sjukdomsförloppet behövs. Detta för att få ökad förståelse för sjukdomarna och hur autoimmuniteten utvecklas.

REFERENSER

- Anfinsen, K., Berendt, M., Liste, F., Haagenzen, T., Indrebo, A., Lingaas, F., Stigen, O., Alban, L. (2008). A retrospective epidemiological study of clinical signs and familial predisposition associated with aseptic meningitis in the Norwegian population of Nova Scotia duck tolling retrievers born 1994-2003. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72: 350-355
- Axelsson, J. (2007). *Tollarsjuka hos Nova Scotia Duck Tolling Retriever- en sjukdomsbeskrivning*. Examensarbete. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Chung, S. A., Chriswell, L. A. (2007). PTPN22: Its role in SLE and autoimmunity. *Autoimmunity* Tillgänglig: doi: 10.1080/08916930701510848 2015-03-03
- Clipstone, N. A., Crabtree, G. R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation, *Nature*, 357: 695-697
- Crow, M. K., Olfieriev, M., Kirou, K. A. (2015) Targeting of type I interferon in systemic autoimmune diseases. *Translational research*, 164:296-305
- Fernando, M. M. A., Stevens, C. R., Walsh, E. C., De Jager, P. L., Goyette, P., Plenge, R. M., Vyse, T. J., Rioux, J. D. (2008). Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *PLoS Genetics* 4:e1000024.
- Graham, R. R., Ortmann, W. A., Langefeld, C. D., Jawaheer, D., Selby, S. A., Rodine, P. R., Baechler, E. C., Rohlf, K. E., Shark, K. B., Espe, K. J., Green, L. E., Nair, R. P., Stuart, P. E., Elder, J. T., King, R. A., Moser, K. L., Gaffney, P. M., Bugawan, T. L., Erlich, H. A., Rich, S. S., Gregersen, P. K., Behrens, T. W. (2002) Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *American Journal of Human Genetics*, 71:543-553.
- Guerini, D. (1997). Calcineurin: Not Just a Simple Protein Phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235: 271-275.
- Guerra, S. G., Vyse, T. J., Cunninghame, D. S. (2012). The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Research & Therapy*. Tillgänglig: doi:10.1186/ar3844 2015-03-03
- Hansson-Hamlin, H., Lilliehöök, I. (2009). A possible systemic rheumatic disorder in the Nova Scotia duck tolling retriever. *Acta Veterinaria Scandinavia*. Tillgänglig: doi: 10.1186/1751-0147-51-16
- Hansson-Hamlin, H., Lilliehöök, I. (2013) Steroid-responsive meningitis-arteritis in Nova Scotia duck tolling retrievers. *Veterinary Record*, 173. Tillgänglig: doi: 10.1136/vr.101847
- Hansson-Hamlin, H., Lilliehöök, I., Trowald-Wigh, G. (2006). Subgroups of canine antinuclear antibodies in relation to laboratory and clinical findings in immune-mediated disease. *Veterinary clinical pathology* 35: 397-404
- Hansson H., Trowald-Wigh, G., Karlsson-Parra, A. (1996). Detection of Antinuclear Antibodies by Indirect Immunofluorescence in Dog Sera: Comparison of Rat Liver Tissue and Human Epithelial-2 Cells as Antigenic Substrate. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10:199-203

- Huang, G. N., Huso, D. L., Bouyain, S., Tu, J., McCorkell, K. A., May, M. J., Zhu, Y., Lutz, M., Collins, S., Dehoff, M., Kang, S., Whartenby, K., Powell, J., Leahy, D., Worley, P. F. (2008). NFAT Binding and Regulation of T Cell Activation by the Cytoplasmic Scaffolding Homer Proteins. *Science*. 319:476-481
- Hughes, A. M., Jokinen, P., Bannasch, D. L., Lohi, H., Oberbauer, A. M. (2010). Association of a dog leukocyte antigen class II haplotype with hypoadrenocorticism in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers. *Tissue antigens*, 75:685-690
- Naito, T., Tanaka, H., Naoe, Y., Taniuchi, I. (2011). Transcriptional control of T-cell development. *International Immunology*, 23, 661-668.
- Pestka, S., Krause, C. D., Walter, M. R. (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews*, 202:8-32
- Randall, R. E., Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 89:1-47
- Rudolf, R., Busch, R., Patra, A. K., Muhammed, K., Avots, A., Andrau, J., Klein-Hessling, S., Serfling, E. (2014). Architecture and expression of the Nfatc1 gene in lymphocytes. *Frontiers in Immunology*. Tillgänglig: doi: 10.3389/fimmu.2014.00021
- Röthlisberger, A., Wiener, D., Schweizer, M., Peterhans, E., Zurbriggen, A., Plattet, P. (2010) Two Domains of the V Protein of Virulent Canine Distemper Virus Selectively Inhibit STAT1 and STAT2 Nuclear Import. *Journal of Virology*, 84:6328-6343
- Serfling, E., Klein-Hessling, S., Patmetshofer, A., Bopp, T., Stassen, M., Schmitt, E. (2006). NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *European Journal of Immunology*, 36:2837-2843.
- Silva, J. D. A., Addobbati, C., Sandrin-Garcia, P., Crovella, S. (2014) Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations. *Current Genomics*, 15: 52-65
- Statens Veterinärmedicinska Anstalt (2014-03-18) *Valpsjuka (Canine distemper) hos hund* <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Hund/Infektionssjukdomar/Valpsjuka/> 2015-03-10
- Strang & MacMillian, (1996). *The Nova Scotia Duck Tolling Retriever*. Alpine Publications
- Svenska Nova Scotia Duck Tolling Retrieverklubben. (2015-02-27). *Rasen*. <http://tollarklubben.se/rasen/> 2015-03-03
- Valdor, R., Macian, F. (2013) Induction and stability of the anergic phenotype in T-cells. *Seminars in Immunology*, 15, 313-320.
- Wilbe, M. (2013). *Discovery of a novel pathway for an SLE-related disease complex in the canine breed Nova Scotia duck tolling retriever*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Wilbe, M., Andersson, G. (2012) MHC Class II is an Important Genetic Risk Factor for Canine Systemic Lupus Erythematosus (SLE)-Related Disease: Implications for Reproductive Success. *Reproduction in Domestic Animals*, 47:27-30

- Wilbe, M., Jokinen, P., Truve, K., Seppala, E. H., Karlsson, E. K., Biagi, T., Hughes, A., Bannasch, D., Andersson, G., Hansson-Hamlin, H., Lohi, H., Lindblad-Toh, K. (2010). Genome-wide association mapping identifies multiple loci for canine SLE-related disease complex. *Nature genetics*, 42:250-255
- Wilbe, M., Jokinen, P., Hermanrud, C., Kennedy, L. J., Strandberg, E., Hansson-Hamlin, H., Lohi, H., Andersson, G. (2009). MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex. *Immunogenetics*, 61:557-564
- Zhong, M., Veillette, A. (2012). Immunology: Csk keeps LYP on a leash. *Nature Chemical Biology*, 8:412-413